

## 審査の結果の要旨

氏名 海老沢 計 慶

一般に、アミノ酸類には医薬品の主成分や原料となるものがあり、その結晶構造と固体物性の関係を理解することは、製剤学を中心に広く薬学領域において重要である。固形製剤の安定性や薬効は、結晶構造や結晶水の存在様式、結晶多形の有無に影響される。それ故、結晶の水素結合様式や熱転移における構造変化、結晶多形間での分子運動性の違い、さらには結晶構造の安定化要因等を原子レベルで解析することは重要な課題である。一方、固体高分解能 NMR 法は、現在では感度及び分解能の著しい向上により、X 線解析と並ぶ有機結晶の重要な構造解析手段と考えられている。このような観点から本研究は、1) Gly の結晶多形系、2) L-Glu アンモニウム 1 水和物結晶系、3) アスパルテーム (L-Asp-L-Phe methylester、以下 AP と略) 結晶系を題材に、アミノ酸類結晶の固体物性を主として固体高分解能 NMR を用いて解析する戦略を検討すると同時に、2) の試料を題材に、固体 NMR による REDOR 法を改良し、従来よりも安価で効率の良い安定同位体単一標識による結晶内の分子内および分子間距離の同時測定法を開発することを目指したものである。

本研究では第一に、Gly の 2 種の多形 ( $\alpha$  晶と  $\gamma$  晶) 間で、構造安定性の違いを解析するための固体 NMR 方法論を検討している。 $\alpha$  晶は常温で準安定形、 $\gamma$  晶は最安定形である。X 線結晶構造の観察から、両形は結晶内の分子パッキングと水素結合様式が明らかに異なることは示されるが、水素結合形成による安定性の違いについては、必ずしもグラフィックス観察だけでは判断できないことが示される。そこで、水素結合様式の違いが Gly の分子運動性に及ぼす影響を調べるため、各多形について固体 NMR による  $T_{1\rho}$  緩和時間解析を行うことで、結晶内の分子運動性を定量的に比較している。その結果、 $\gamma$  晶の緩和時間は  $\alpha$  晶に比べて顕著に長く、 $\gamma$  晶の方が  $\alpha$  晶に比べて結晶中のアミノ基の回転運動が強く束縛されており、アミノ基の回転障壁エネルギー  $\Delta E$  は約 6 kJ/mol 大きいこと、即ち、結晶内の水素結合が全体としてより強固に形成されていることを明らかにしている (表 1)。ついで、緩和解析で求めた  $\Delta E$  (実験値) を計算化学的に再現するために、各多形のアミノ基回転に伴うエネルギープロファイルを計算し検討している。その結果、構造計算で通常用いられる誘電率 (1.0) を 1.8 まで増大させること、即ち、静電項の寄与を若干減少させることで、 $\Delta E$  の実測値を最も良く再現できることを明らかにしている。解離基由来の静電相互作用が構造安定化の主な要因となるアミノ酸結晶系では、構造計算上、電荷の分極効果を正確に見積もることは一般に難しく、構造計算による多形間の安定性解析には、固体 NMR による  $\Delta E$  の算出とそれに基づく誘電率補正が有効であることを示している。さらに、誘電率を

補正した両多形の分子動力学計算を行うことで、 $\gamma$  晶の方が  $\alpha$  晶に比べて、結晶内のアミノ基の回転運動がより束縛されている状況をシミュレートできることを明らかにしている。

表1 Gly 結晶多形における緩和時間および活性化エネルギー  $\Delta E$  の比較

	$T_{1\rho}$ 緩和時間	$\Delta E$ (実験値)	$\Delta E$ (計算値 $\epsilon=1.0$ )	$\Delta E$ (計算値 $\epsilon=2.0$ )
$\gamma$ 晶	20 sec	30	52.59	40.08
$\alpha$ 晶	2 sec	24	40.77	34.94
$\Delta \Delta E$		6	11.82	5.14

エネルギーの単位は全て kJ/mol

第二に、結晶水を含む結晶では、加熱による脱水転移が不可逆過程であるか可逆過程であるかは結晶の安定性研究において重要な側面であり、本研究では、L-Glu アンモニウム 1 水和物結晶を題材として、不可逆的な熱転移過程を解析するための戦略を検討している。まず、熱重量分析と粉末 X 線回折により、本結晶の熱安定性と転移に伴う結晶形変化を解析することで、熱転移の開始温度が 75°C であること、88°C 付近で比較的不安定な転移中間体が生成すること、および本結晶が最終的には Glu 多形の 1 つである無水  $\beta$  晶に転移することを明らかにしている。ついで、固体高分解能  $^{13}\text{C}$ -NMR 測定により熱転移による構造変化を調べることで、転移中間体では、結晶中に少なくとも 2 種類の状態が生じることを明らかにしている。さらに、Glu 多形 ( $\alpha$  晶と  $\beta$  晶) における分子配座や固体 NMR スペクトルと比較することで、転移中間体においては水素結合の切断に伴う分子配座の変化が主に  $C_\beta$  と  $C_\gamma$  シグナルの 2 状態に影響していること、また、転移中間体から  $\beta$  晶への脱水転移に伴って、Glu 側鎖の根元に近い内部回転角が gauche 配座から trans 配座へと大きく変化することを推定している。

第三に、本研究ではアスパルテーム (AP) 結晶を題材に可逆的な熱転移過程を解析するための戦略を検討している。AP は水和量の違いによる多形を示す例であり、4 種の多形の内、IIA 晶は比較的広い温度範囲で結晶型が安定でありながら、その安定化機構の詳細が不明であった。まず、熱分析と粉末 X 線回折により、IIA 晶の熱安定性と転移に伴う結晶形変化を解析することで、通常、室温では 1/2 水である IIA 晶が 40°C ~ 50°C で、結晶型は IIA 型のまま結晶水含量が 1/3 水である準安定状態を経由し、55°C 付近から IIB 晶へ転移を開始することを明らかにしている。即ち、IIA 晶の結晶形安定性は結晶水量にこのような許容幅があることが重要な要因であること、このような結晶物性は、IIA 晶の結晶水構造が結晶表面まで続く結晶水カラムを形成しているという構造的特徴に由来することを推察している。ついで、この転移中間体 (1/3 水状態) の構造情報を得るために固体  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルの温度変化を調べることで、転移中間体では各種の炭素シグナルが明瞭に 2 状態となることを示している。この内、Asp 側鎖のカルボキシル基については、脱水による解離基の電子状態変化がシグナル変化の要因であり、Phe 側鎖の  $\gamma$  炭素については、T1 $\rho$ 緩和解析の結果

をもとに、結晶内の分子運動性の変化が主な要因であると推定している。さらに、IIA 晶と転移中間体、各々の分子動力学計算を行うことで、転移中間体では Phe 残基の運動性に変化が生じ、少なくとも 2 種以上の状態が結晶内に生じることを示唆している。以上、本研究は結晶構造と結晶物性(結晶形安定性)の関係を検討する上で、一般に適用可能かつ有用な解析例を示していると共に、結晶水の存在様式が結晶物性に大きく関与した例を示し得たと考えられる。

本研究では第四に、固体 NMR 距離測定法である REDOR 法の改良を検討している。従来、本手法を用いて複数の原子間距離を求めるためには、複数の 2 重標識同位体試料を必要としたため、費用も高く、結晶転移に伴う分子配座や分子配置の変化を検討することは現実に困難であった。本研究では、Glu のアミノ基の窒素原子を  $^{15}\text{N}$  で単一標識した  $^{15}\text{N}$ -Glu アンモニウム 1 水和物結晶について、窒素原子と双極子結合を示す天然存在比  $^{13}\text{C}$  核の REDOR を測定することで、安定同位体核 ( $^{15}\text{N}$ ) とその他全ての天然存在比  $^{13}\text{C}$  核との原子間距離測定を試み、分子中の全ての  $^{13}\text{C}$  核と標識  $^{15}\text{N}$  核の原子間距離を同時に測定できることを明らかにしている。また天然存在比  $^{13}\text{C}$  核を観測することで、分解能の向上が見られることから、複雑な分子の原子間距離測定に適用できることを示唆している。さらに観測値と理論値の RMSD 解析により、分子内 C-N 間距離と分子間 C-N 間距離の分離観測を検討することで、原子核の対によってはかなり良い精度で、2 種類の距離を個別に決定することに成功し、転移中間体おけるの構造推定などにつながり得る一般的な手法を開発している(表 2)。

表 2 アミド窒素  $^{15}\text{N}$  核と各炭素核間の距離(Å)

	REDOR		X線構造	
	$r_{\text{CN1}}$	$r_{\text{CN2}}$	分子内	分子間
$^{13}\text{C}=\text{O}$	2.545	3.725	2.492	3.687, 6.113
$^{13}\text{C } \alpha$	1.465	3.360	1.497	3.857, 4.722
$^{13}\text{C } \beta$	2.510	3.665	2.448	3.700, 4.739
$^{13}\text{C } \gamma$	3.525	3.800	3.835	4.017, 4.133
$^{13}\text{C } \delta$	3.340	3.410	4.977	3.432, 3.796

本研究により、アミノ酸・ペプチド結晶の固体物性を主として固体高分解能 NMR 法により解析するための戦略に関して種々の重要な知見を得ている。特に結晶安定性の要因を調べる上で有用な方法論を提示するとともに、既存の固体 NMR による距離測定法の改良に関しても新しい知見を得ている。

以上、海老沢計慶の研究成果は、有機結晶の安定性研究や結晶転移に伴う構造変化の解析、製剤学上重要な結晶多形の物性研究に資するところ大であり、博士(薬学)の学位を授与するに十分なものと認めた。